

## CONTROL DE CALIDAD DE BACTERIOLOGÍA (B-1/09)

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa identificada por el laboratorio de referencia como *Capnocytophaga sputigena*, mediante pruebas convencionales y secuenciación. La historia clínica correspondía a una paciente mujer de 38 años de edad que ingresó en el servicio de Hematología por presentar una leucemia mieloblástica aguda. Durante el ingreso, presentó un cuadro de fiebre con neutropenia (<500 neutrófilos/ $\mu$ L), a pesar de estar recibiendo profilaxis con ciprofloxacino. En la exploración física se observó una considerable mucositis. Se obtuvieron muestras de orina, sangre y heces para estudio bacteriológico y se inició una pauta de antibioterapia empírica con imipenem. Todas las determinaciones resultaron negativas pero, a los 4 días de incubación, se observó en 2 de los frascos de hemocultivos, el crecimiento de la bacteria objeto de este control.

Se solicitó a los participantes la **identificación** y el estudio de **sensibilidad** de la cepa remitida. Así mismo, podían hacerse en la hoja de respuesta los **comentarios** microbiológicos, clínicos, terapéuticos, etc. que se estimasen oportunos. El objetivo principal de este control fue evidenciar la capacidad de los participantes para detectar e identificar *Capnocytophaga* en la muestra problema, que se trata de un bacilo gramnegativo de crecimiento exigente.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La cepa fue enviada a los 269 centros participantes, de los que 229 remitieron hoja de respuesta (85,5%). Únicamente 23 participantes (10,0%) identificaron correctamente el género y la especie. Lo más frecuente fue alcanzar la identificación de género, lo que refirieron 136 laboratorios (59,4%), mientras que 16 (7,0%) informaron otras especies de *Capnocytophaga* (tabla 1). Cinco participantes declararon no obtener crecimiento tras el subcultivo, presumiblemente por emplear condiciones que no permitían el crecimiento de esta bacteria.

Teniendo en cuenta el nivel de dificultad de este control, el Programa de CC SEIMC consideró como válida y suficiente la identificación de género *Capnocytophaga*, o una especie distinta de *C. sputigena*, reservando para ésta última la calificación de identificación óptima. Esto se aplica especialmente para los laboratorios que utilizan la secuenciación como procedimiento de identificación, ya que la diferenciación de especie es muy difícil con métodos fenotípicos convencionales. Así, 175 laboratorios (76,4%) obtuvieron una respuesta correcta, porcentaje inferior a lo habitual, pero similar al del control B-3/04 en que se remitió también una cepa del género *Capnocytophaga* (75,5%).

Llama la atención los 25 participantes (10,9%) cuya identificación fue *Sphingomonas paucimobilis*, lo cual fue atribuible al empleo de un determinado sistema comercial, como se verá más adelante. Además, en este control, a diferencia de otros, se recibió un notable número de respuestas (n=22) con una amplia miscelánea de identificaciones, reflejo de la dificultad en sí, pero también de la incapacidad de los sistemas comerciales identificar la cepa: *Aerococcus viridans*, bacilo anaerobio, bacilo gramnegativo, bacilo gramnegativo no fermentador, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium tertium*, estafilococo coagulasa negativa, *Fusobacterium nucleatum*, *Gemella morbillorum*, género *Bacillus*, género *Bacteroides*, género *Lactobacillus*, género *Sphingomonas*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Prevotella melaninogenica*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus schleiferi*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

**Tabla 1. Resultados de la identificación bacteriana.**

Identificación	Número	%
Género <i>Capnocytophaga</i>	136	59,4
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	23	10,0
<i>Capnocytophaga haemolytica</i>	13	5,7
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	3	1,3
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	25	10,9
Miscelánea <sup>a</sup>	22	9,6
No se obtiene crecimiento	5	2,2
No informa	2	0,9
Total	229	100,0

<sup>a</sup>Ver texto.

De los 224 laboratorios que obtuvieron crecimiento, algo más de la mitad de ellos (125, el 55,8%) emplearon técnicas comerciales para identificar la cepa (tablas 2 y 3). En esta ocasión, 105 centros (46,9%) usaron técnicas manuales. Seis participantes (2,7%) realizaron un estudio de secuenciación, lo que indica la dificultad que entrañaba la identificación de especie de la cepa.

**Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.**

Método	Número	%
Comercial	100	44,6
Manual	81	36,2
Manual + comercial	24	10,7
Secuenciación	5	2,2
Comercial + secuenciación	1	0,5
No informa	13	5,8
Total	224	100,0

**Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.**

Método comercial	Número	% uso	% acierto
Galerías API			
Rapid ID 32A	35	28,0	100,0
API 20NE <sup>a</sup>	17	13,6	82,3
API no especificado	6	4,8	66,7
API 20A	4	3,2	25,0
API Strep	1	0,8	0,0
Vitek/Vitek 2	46	36,8	50,0
Microscan	5	4,0	80,0
Rapid ANA System II	3	2,4	100,0
BBL Crystal	2	1,6	50,0
Wider	2	1,6	0,0
Phoenix	1	0,8	0,0
Rapid NF Plus	1	0,8	0,0
No especifica el sistema utilizado	2	1,6	100,0
Total	125	100,0	69,6

<sup>a</sup>En ocasiones, complementados con el API 20E.

Los equipos comerciales más empleados fueron el sistema Vitek/Vitek 2 (46 centros), seguidos de las galerías rapid ID 32A (35 centros) y API 20NE (17 centros), estas últimas asociadas, en ocasiones, con la galería API 20E. El Programa de Control de Calidad aceptó como válidas las identificaciones *C. sputigena*, género *Capnocytophaga*, así como los que informaron una especie de *Capnocytophaga* distinta a *C. sputigena*.

Los mejores resultados se obtuvieron con los sistemas comerciales rapid ID 32A y rapid ANA System II (100% de aciertos), seguidos del API 20NE. Así, los 35 participantes que emplearon el rapid ID 32A y los 3 participantes que realizaron el rapid ANA System II identificaron correctamente, al menos, el género de la cepa control. En el caso del API 20NE (en ocasiones usado junto con el API 20E), fueron 14 de 17 centros (82,3%) los que informaron correctamente el género. El sistema Vitek se reveló insuficiente para alcanzar la identificación pues, en conjunto, sólo 23 de 46 participantes (50,0%) remitieron la respuesta aceptable, si bien hay que tener en cuenta que la mayoría de los laboratorios que usaron la tarjeta NH acertaron correctamente la identificación del género, mientras que aquellos centros que usaron únicamente la tarjeta GN informaron *Sphingomonas paucimobilis*.

De los 23 centros que identificaron correctamente el género y la especie *C. sputigena*: 10 emplearon únicamente pruebas manuales, 4 usaron pruebas manuales junto con una técnica comercial (2 rapid ID32A, 1 API no especificado y 1 Vitek), 4 usaron únicamente un sistema comercial (2 API 20NE, 1 rapid ID32A y 1 API no especificado), y 5 realizaron la identificación mediante secuenciación (uno de ellos junto con el rapid ID 32A).

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

### GENERALIDADES

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta únicamente a los 175 centros que realizaron una identificación mínima de género *Capnocytophaga*. De ellos, 32 no realizaron el estudio de sensibilidad, con lo que se analizaron 143 antibiogramas. Un total de 121 (84,6%) realizaron una técnica disco-placa, 100 de ellos (69,9%) de forma única. Se realizó E-test® en 30 laboratorios (21,0%), 12 de ellos como único método. El número de participantes que determinaron la CMI mediante una técnica automatizada de microdilución en caldo fue de 5 (3,5%), mientras que los que realizaron el método de concentración crítica fue de 4 (2,8%). De los 5 centros que determinaron la CMI mediante un sistema automatizado, dos de ellos usaron Sensititre (40,0%), otros dos Wider (40,0%), mientras que el centro restante empleó Microscan (20,0%). Seis participantes no especificaron el método empleado. Los resultados se resumen en la tabla 4.

**Tabla 4. Métodos empleados en el antibiograma.**

Método	Número	%
Disco-placa	100	69,9
Disco-placa + E-test®	16	11,2
E-test®	12	8,4
CMI por microdilución	2	1,4
CMI + disco-placa	2	1,4
Disco-placa + concentración crítica	2	1,4
Concentración crítica	1	0,7
E-test® + concentración crítica	1	0,7
CMI + disco-placa + E-test®	1	0,7
No especificado	6	4,2
Total	143	100,0

Los resultados de sensibilidad antibiótica suministrados por el centro que actuó como laboratorio de referencia (tabla 5) fueron obtenidos por disco-placa y E-test® y se muestran en la tabla 6. Como siempre, esta lista se incluye a título meramente informativo, como término de comparación para los participantes, sin que suponga una recomendación de uso en el tratamiento de las infecciones por esta bacteria. El laboratorio de referencia usó los criterios del CLSI correspondientes al grupo de microorganismos "fastidiosos" para la interpretación de los resultados

**Tabla 5. Sensibilidad antibiótica de la cepa.**

<b>Antibiótico</b>	<b>Interpretación<sup>a</sup></b>
Amikacina	R
Ampicilina	R
Amoxicilina-clavulanato	S
Cefotaxima	S
Cefuroxima	R
Ciprofloxacino	R
Claritromicina	S
Clindamicina	S
Cotrimoxazol	R
Eritromicina	S
Gentamicina	R
Imipenema	S
Meropenema	S
Penicilina	R
Piperacilina-tazobactam	S
Rifampicina	S
Tobramicina	R

<sup>a</sup>S: sensible; R: resistente.

Por otra parte, se solicitó a tres profesionales con experiencia una lista de los antibióticos que consideraran que debían ser incluidos en el estudio de sensibilidad de esta bacteria, sirviendo así como una aproximación o guía general. Desde el Programa de Control de Calidad, se considera que la adecuación de los antibióticos seleccionados por cada centro puede considerarse como un criterio añadido de la calidad que ofrece. Como en otras ocasiones, estos profesionales basaron su selección en los siguientes criterios: a) tratarse de opciones terapéuticas de primera elección, b) constituir alternativas en ciertas situaciones clínicas, c) servir como criterio adicional para la identificación precisa de la especie bacteriana, marcador fenotípico, etc. y d) para conocer la epidemiología de la resistencia en un determinado ámbito geográfico. Las distintas respuestas de los expertos se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6. Antibiógrama ideal según tres profesionales.**

<b>Experto 1</b>	<b>Experto 2</b>	<b>Experto 3</b>
Penicilina		
Ampicilina	Ampicilina	Ampicilina
Amoxicilina-clavulanato	Amoxicilina-clavulanato	Amoxicilina-clavulanato
Cefuroxima		Cefuroxima
Cefotaxima	Cefotaxima	Cefotaxima
Imipenema	Imipenema	Imipenema
Eritromicina		Eritromicina
Clindamicina	Clindamicina	Clindamicina
Ciprofloxacino	Ciprofloxacino	Ciprofloxacino
Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	
	Amikacina	Amikacina
	Aztreonam	
	Metronidazol	
	Vancomicina	
		Piperacilina-tazobactam
		Colistina

Las respuestas de los laboratorios variaron desde aquéllos que refieren muy pocos antibióticos en sus pruebas de sensibilidad, a otros que estudian hasta 16 diferentes. Los antibióticos que fueron informados por un mayor número de participantes se ajustan bastante a las necesidades terapéuticas y al "patrón ideal" que se desprende de la opinión de dos o más de los expertos: ampicilina, amoxicilina-clavulanato, cefuroxima, cefotaxima, imipenema, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, cotrimoxazol y amikacina.

#### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS**

En la tabla 7 se resumen los resultados de las pruebas cualitativas de sensibilidad cuando el número de respuestas para un determinado antibiótico fue igual o superior a 25.

**Tabla 7. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.**

Antibiótico	Número	Interpretación <sup>a</sup>		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Penicilina	55	5 (9,1)	0	50 (90,9)
Ampicilina	48	5 (10,4)	1 (2,1)	42 (87,5)
Amoxicilina-clavulanato	133	126 (94,7)	3 (2,3)	4 (3,0)
Cefotaxima	103	98 (95,1)	0	5 (4,9)
Imipenema	103	103 (100,0)	0	0
Piperacilina-tazobactam	30	30 (100,0)	0	0
Ciprofloxacino	105	34 (32,4)	4 (3,8)	67 (63,8)
Cotrimoxazol	58	5 (8,6)	0	53 (91,4)
Eritromicina	40	39 (97,5)	0	1 (2,5)
Clindamicina	79	79 (100,0)	0	0
Gentamicina	70	5 (7,1)	1 (1,4)	64 (91,5)
Amikacina	26	4 (15,4)	0	22 (84,6)

<sup>a</sup>Los números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico.

De forma mayoritaria, los participantes mostraron unos resultados concordantes con los aportados por el laboratorio de referencia para todos los antibióticos, observándose cierta discrepancia con el ciprofloxacino.

#### UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

Respecto a la necesidad de utilizar un laboratorio externo para la identificación de la cepa o para el estudio de sensibilidad, se obtuvieron los siguientes datos: 204 laboratorios (91,1%) afirmaron no haberlo utilizado, 8 centros (3,6%) declararon haberlo requerido y 5 centros (2,2%) lo utilizaron parcialmente. Hubo 7 participantes (3,1%) que no aportaron información al respecto.

#### COMENTARIOS

Algunos laboratorios señalaron explícitamente que la cepa era productora de  $\beta$ -lactamasa (47). Otros comentarios mayoritarios fueron acerca de la inexistencia de puntos de corte estandarizados para la interpretación del antibiograma (15), sobre recomendaciones terapéuticas, principalmente con cefalosporinas de tercera generación, imipenema o amoxicilina-clavulanato (13); y que no pudieron realizar el antibiograma por falta de crecimiento en el subcultivo (9).

Ocho participantes indicaron las pruebas bioquímicas manuales que habían realizado para lograr la identificación y otros seis centros propusieron en los comentarios qué especie de *Capnocytophaga* era la más probable. Cinco centros expresaron que no disponían de la técnica adecuada para realizar el antibiograma y otros cinco indicaron que la cepa era resistente al ciprofloxacino.

Por último, tres centros manifestaron explícitamente el grado de dificultad que tenía este control. Desde el Programa de Control de Calidad se reconoce tal circunstancia, aunque se debe explicar que el diseño de los controles busca conscientemente, en ocasiones, elevar ese nivel de dificultad, con el fin de demostrar las diferencias entre centros, pero también para poner de manifiesto la buena capacitación general de los laboratorios de Microbiología españoles respecto a laboratorios generalistas. Teniendo en cuenta todo esto, se puede considerar aceptable, pero mejorable, el porcentaje de acierto del 76,4%, más aún teniendo en cuenta que una parte no despreciable de fallos fue atribuible a las insuficiencias de los sistemas comerciales de identificación. En este sentido, una lección evidente de este control es que no conviene confiar en exceso en estos sistemas, y que el buen criterio profesional del microbiólogo debe guiar siempre la resolución de los problemas analíticos.